

И.М. Улюкин¹, Ю.И. Буланьков¹, В.Н. Болехан¹,
А.В. Апчел², Е.С. Орлова¹, Н.Г. Лебедева¹

Проблемы лабораторного определения гемоконтактных инфекций

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²3-й военный госпиталь внутренних войск Министерства внутренних дел, Санкт-Петербург

Резюме. В настоящее время в лечебно-диагностическом процессе имеет место увеличение хирургической активности и агрессивности медицинских вмешательств, которые производятся на неблагоприятном фоне (иммуносупрессия, ранний неонатальный период жизни, пожилой возраст), при значительном техническом усложнении диагностических и лечебных манипуляций. Трансфузиологическое пособие применяется преимущественно в отделениях хирургического профиля с высокой востребованностью гемокомпонентов, при этом наиболее востребованы плазма и эритроцитная масса, а также альбумин и тромбоцитный компонент. Скрининг на гемотрансмиссивные инфекции для исключения донаций крови с риском передачи инфекции от доноров реципиентам является важнейшей составной частью процесса обеспечения максимально безопасной трансфузии. Показано, что совершенствование методик исследования донорской крови на маркеры гемоконтактных инфекций и внедрение новых высокотехнологичных методик лабораторной диагностики в службу крови позволит уменьшить вероятность инфицирования реципиента при гемотрансфузии, хотя минимальный риск посттрансфузионной передачи всё же существует. Обсуждены причины появления ложноположительных и ложноотрицательных результатов, атипичных ответов. Отмечено, что эффективность скрининга зависит от корректного использования диагностических методик в лабораториях, должным образом оснащенных и укомплектованных персоналом, работающим в рамках отлаженных систем качества.

Ключевые слова: гемоконтактные инфекции, вирусные гепатиты В и С, инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека, компоненты донорской крови, лабораторная диагностика, ложноположительные и ложноотрицательные результаты, атипичные ответы.

В настоящее время в лечебно-диагностическом процессе имеют место увеличение хирургической активности и агрессивности медицинских вмешательств, которые производятся на неблагоприятном фоне (иммуносупрессия, ранний неонатальный период жизни, пожилой возраст), при значительном техническом усложнении диагностических и лечебных манипуляций и неуклонно растущей тенденции к снижению иммунологической реактивности значительной части пациентов [13]. Так, для обеспечения положительных результатов лечения в Москве, вне всяких чрезвычайных ситуаций, ежедневно переливается от 500 до 1000 доз донорской крови [2]. В современных условиях трансфузиологическое пособие применяется преимущественно (90,8%) в отделениях хирургического профиля с высокой (около 13%) востребованностью гемокомпонентов [7], при этом наиболее востребованы плазма и эритроцитная масса (45,9 и 40,2%, соответственно), а также альбумин (4,9%) и тромбоцитный компонент (2,4%).

С другой стороны, известно, что вследствие большого числа переливаний больным донорских компонентов крови ведущим фактором риска гемоконтактных инфекций, наряду с манипуляционным, является гемотрансфузионный. Это происходит, в том числе, и потому, что за последние 20 лет произошло изменение структуры донорских кадров [10].

Материальная заинтересованность привела к участию в донорстве малообеспеченных лиц, которые пытаются утаить перенесенные заболевания и реальное состояние здоровья, а это способствует риску передачи вирусных и бактериальных инфекций и, следовательно, увеличению абсолютного брака крови. Установлено, что частота выявления маркеров инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции) у доноров в России в период с 2007 по 2010 гг. увеличилась в 1,4 раза (с 0,07 до 0,1%) и в среднем составила $0,085 \pm 0,006\%$ [12]. При этом средняя частота выявления антител к вирусу гепатита С (ВГС) за это время составила $1,31 \pm 0,11\%$, средняя частота выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (ВГВ) – $0,74 \pm 0,08\%$, а повышение активности аланинаминотрансферазы – в 41,05% случаев. Отмечено также, что среди доноров (около 50% из которых составляют первичные), сдающих кровь в период катастрофы, отмечается более чем двукратный рост встречаемости маркеров гемотрансмиссивных заболеваний [2].

Отдаленные клинические и социальные последствия инфицированности реципиентов крови вирусными инфекциями очевидны. В исследовании О.Е. Кузнецова и соавт. [6] показано, что из одной дозы цельной крови, полученной от ВГС-положительного донора, возможно заготовить три гемокомпонента,

которые могут быть перелиты трем потенциальным реципиентам, расходы только на лечение которых составили бы в среднем от 1,2 млн рублей.

Каковы же особенности лабораторной диагностики наиболее значимых гемоконтактных инфекций? Так, считается, что в России около 8 млн человек являются носителями ВГВ, при этом на территории страны встречаются все его генотипы, хотя распределение их неоднородно [1, 11, 14]. Возможно и инфицирование несколькими различными подтипами ВГВ [33]. Этот факт необходимо учитывать в контексте динамического феномена с учетом все более активных миграционных процессов среди населения. Есть данные о неодинаковой эффективности противовирусных препаратов в отношении различных генотипов ВГВ [34].

Известно, что серологическими маркерами репликации ВГВ являются анти-НВс-IgM, HBeAg, дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и ДНК-полимераза вируса, которые обнаруживаются при остром ВГВ с первых дней клинических проявлений и могут обнаруживаться при обострении хронического заболевания. Однако наличие антител не дает возможности дифференцировать острую, хроническую или перенесенную в прошлом инфекцию.

Поверхностный антиген ВГВ (HBsAg) в большинстве случаев обнаруживается уже в инкубационном периоде (через 3–5 недель от момента инфицирования), при остром течении гепатита выявляется в крови в течение 5–6 месяцев. Методы иммуноферментного анализа (ИФА), применяемые для определения HBsAg в сыворотке крови, являются скрининговыми, но в очень редких случаях могут давать ложноположительные результаты. Поэтому в случае получения положительного результата на HBsAg для подтверждения его специфичности выполняется подтверждающий тест в виде повторного исследования сыворотки крови пациента с иммуноингибированием и разведением (HBsAg confirmatory). Из-за наличия различных форм HBsAg в сыворотке, при его обнаружении невозможно дифференцировать заболевание и HBsAg-носительство. В связи с этим проводятся дополнительные исследования – определение ДНК ВГВ, HBeAg и антител к HBeAg.

Длительность циркуляции антигена инфекционности ВГВ (HBeAg) имеет важное прогностическое значение: выявление этого антигена через два и более месяцев после начала заболевания служит признаком возможной хронизации заболевания. Наличие суммарных anti-HBe является показателем начала сероконверсии и свидетельствует о прекращении репликации вируса. Однако обнаружение этих антител не всегда является показателем отсутствия инфекционности, так как иногда возможно появление мутантной, дефектной HBeAg-отрицательной формы ВГВ, но при этом высокая репликативная активность вируса сохраняется (хотя в крови и обнаруживаются HBeAg-антитела).

Считается, что выявление HBeAg без присутствия HBsAg в сыворотке крови в подавляющем большин-

стве случаев указывает на ложный результат анализа. Для разграничения ложноположительных от истинно положительных результатов применяется тест нейтрализации HBsAg-специфической сывороткой. Однако больные, инфицированные мутантным вирусом, могут оставаться серонегативными по HBeAg, несмотря на сохраняющуюся инфекционность и наличие анти-HBe. Кроме того, лекарственная резистентность может одновременно сопровождаться изменением HBsAg, что приводит к ускользанию мутантов от диагностических тестов и от антител, вызванных вакцинацией [46, 52]. Считается, что в России более 80,0% больных хроническим ВГВ имеют HBeAg-негативный вариант возбудителя [3]. Вместе с тем, увеличение длительности инфицирования приводит к росту удельного веса мутантных штаммов, что приводит к снижению уровня безопасности переливаемой крови. Поэтому наиболее чувствительным маркером продолжающейся репликации ВГВ является наличие ДНК ВГВ в сыворотке крови [43].

Необходимо отметить и коморбидный ВГВ вирус гепатита Д (ВГД), лабораторная диагностика которого осуществляется путем обнаружения антигена, антител к нему и РНК ВГД [5]. Суммарные анти-ВГД классов IgG и IgM обнаруживаются спустя 1–2 недели после появления клинических признаков заболевания. Антиген ВГД определяется только у 25% больных и обычно исчезает вместе с исчезновением HBsAg. При коинфекции в большинстве случаев суммарные анти-ВГД обнаруживаются в течение заболевания. Их титр обычно снижается до практически неопределяемых уровней после выздоровления и не сохраняется никаких серологических маркеров того, что человек был когда-либо инфицирован ВГД. При суперинфекции же у больных с хронической ВГВ-инфекцией серологическая картина имеет следующие характерные особенности: титр HBsAg снижается к моменту появления антигена ВГД в сыворотке; ВГД-антиген и рибонуклеиновая кислота (РНК) ВГД продолжают определяться в сыворотке, так как обычно у большинства (70–80%) пациентов с ВГД-суперинфекцией развивается хроническая инфекция, в отличие от случаев коинфекции; определяются высокие титры анти-ВГД классов IgM и IgG, которые сохраняются неопределенное время.

Реактивация ВГД характерна для прогрессирования иммунодефицита (или может развиваться после отмены нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы вируса, используемых для антиретровирусной терапии хронического ВГВ) [42, 43]. Поэтому у всех пациентов с определяемым HBsAg рекомендуют определять ВГД-виремию [46]. РНК ВГД обнаруживается в крови при появлении клинических признаков заболевания. Как правило, результат исследования на ДНК ВГВ в этот период отрицательный. В случае микст-гепатитов у больных с ВГД преобладает репликация именно этого вируса при низком уровне ВГВ- и ВГС-виремии, а также быстрое развитие цирроза печени. Хотя обнаружение ВГД-антигена и РНК ВГД в сыворотке крови или ткани печени свидетельствует о

наличии активной ВГД-инфекции, следует отметить, что эти маркеры могут не обнаруживаться в сыворотке больных фульминантным ВГД.

В связи же с тем, что при опасном контакте с кровью вероятность заразиться ВГС в 10 раз выше, чем вероятность заразиться ВИЧ, риск сочетанной инфекции особенно высок у пациентов, которым переливают кровь и ее компоненты, а также у инъекционных наркотики потребителей.

Серологическая лабораторная диагностика ВГС основана на обнаружении в образцах биологических жидкостей человека специфических маркеров вируса: антител к антигенам ВГС, относящихся к иммуноглобулинам классов G и M, а также нуклеиновой кислоты возбудителя (РНК ВГС) [15]. Антитела к антигенам ВГС обычно определяют спустя 6–8 недель после инфицирования, в единичных случаях позже. Наличие анти-ВГС-иммуноглобулинов класса M может свидетельствовать как об остром заболевании, так и об обострении хронического, а также о стадии выздоровления после ВГС. Отрицательный результат не исключает недавно приобретенную ВГС-инфекцию, а также хронический ВГС вне обострения (при положительном результате исследования суммарных антител). В случае получения положительного результата для подтверждения его специфичности используют подтверждающий тест в виде определения в сыворотке крови пациента широкого спектра антител к белкам, специфичным для ВГС (core, NS1, NS2, NS3, NS4, NS5). Исследование считается положительным при выявлении антител к двум или более белкам вируса.

К сожалению, до настоящего времени нет референс-тест-системы для определения антител к антигенам ВГС, которая позволяла бы однозначно получить окончательный результат, так как примерно 1% тестируемых образцов крови, даже при соблюдении всех правил постановки ИФА, дает противоречивые результаты, т.е. данные сыворотки в одних тест-системах определяются как положительные, в других – как отрицательные, в третьих дают неопределенный (сомнительный) результат.

Использование в качестве подтверждающего теста иммунного блотинга (вестерн-блота) (ИБ) также имеет свои недостатки. Отмечено, что некоторые наборы для ИБ по чувствительности уступают ИФА-диагностикумам, т.е. дают ложноотрицательные результаты [16]. Возможно и получение ложноположительных результатов, которые обусловлены, в частности, тем, что интерпретация результатов анализа проводится с отклонениями от заложенных в инструкции к набору рекомендаций. Использование для подтверждения скрининговых результатов ИБ с применением наборов различных фирм, в свою очередь, также может привести к получению противоречивых результатов.

Поэтому РНК вируса необходимо определять в случае положительного результата исследования на антитела, и, кроме того, при отрицательном результате, если подозревается ВГС (особенно в случае

«диализных» пациентов). Наличие этого маркера в фазе «серологического окна» (в период отсутствия антител к ВГС) – важный критерий диагноза в комплексе диагностических признаков острого ВГС. Однако наличие антител к ВГС при отсутствии РНК ВГС может свидетельствовать как об элиминации вируса из крови, так и о низком (ниже уровня определения) уровне вирусемии. То есть, с одной стороны, отсутствие РНК ВГС в позитивных по ИФА образцах сывороток крови не может быть использовано для разграничения хронического ВГС и ложнопозитивного результата, полученного при определении антител к антигенам ВГС. С другой стороны, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет обнаружить у обследуемого пациента РНК ВГС на начальных стадиях развития инфекции, когда детекция специфических антител к вирусу ещё не возможна.

В случае же сочетанной инфекции «ВГВ+ВГС» имеет место реципрокное ингибирование репликации вирусов, вследствие чего преобладает репликация одного из них. Вместе с тем, в динамике заболевания можно наблюдать преобладание репликации то одного, то другого вируса, хотя у больных с выраженной иммуносупрессией репликация всех вирусов гепатитов может протекать одновременно [35, 36].

Существуют сложности и в лабораторной диагностике ВИЧ-инфекции. Так, обычно диагноз этого заболевания устанавливается при обнаружении антител к вирусу, вирусных антигенов, вирусной РНК/ДНК, или при выделении культуры вируса [32].

В настоящее время выделяют два типа ВИЧ: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, аминокислотные последовательности которых гомологичны на 40–60%. Поэтому в 20–30% случаев, в зависимости от применяемой методики ИФА, у больных ВИЧ-2-инфекцией получают отрицательный результат серологического тестирования на ВИЧ-1.

Группа ВИЧ-1 состоит из подтипов, обозначаемых буквами A, B, C, D, F, N, G, H, J, K, O, и 15 циркулирующих рекомбинантных форм (CRF). Большинство случаев ВИЧ-инфекции приходится на долю шести разновидностей ВИЧ-1 четырех подтипов (A, B, C, D) и двух циркулирующих рекомбинантных форм – CRF01_AE и CRF02_AG. В основном случаи ВИЧ-инфекции в мире вызваны ВИЧ-1, за исключением незначительного количества случаев, вызванных штаммами ВИЧ-2, происходящими из Западной Африки.

Инфицирование ВИЧ-2 следует исключать в следующих случаях: у пациентов родом из стран Восточной Африки; у пациентов с неопределяемой вирусной нагрузкой (ВН – количество копий РНК вируса в 1 мл плазмы крови) при отсутствии антиретровирусной терапии (АРВТ); у пациентов, которые могли заразиться ВИЧ-2 по данным эпидемиологического анамнеза; у пациентов, у которых результаты ИБ на ВИЧ-1 отрицательны, сомнительны или атипичны.

Дополнительное обследование на ВИЧ-2 включает ИФА с применением одобренных FDA (управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов Соединенных Штатов Америки)

тест-систем, способных отличить антитела к ВИЧ-1 от антител к ВИЧ-2, а также качественную ПЦР на ДНК ВИЧ-2 [20, 53]. Однако есть штаммы ВИЧ-2, не выявляемые с помощью ПЦР, разработанной для обнаружения эндемичного ВИЧ-2 [50].

Диагностические алгоритмы выявления «двойной» инфекции ВИЧ-1 и ВИЧ-2 пока не стандартизованы, однако ВИЧ-2-инфекцию можно заподозрить при обнаружении сомнительного сочетания полосок ИБ, свидетельствующего о наличии антител к gag-белкам (p66, p51, p32) и в то же время об отсутствии антител к env-белкам (gp160, gp120, gp41). Из всех одобренных FDA тест-систем для экспресс-диагностики ВИЧ-инфекции только OraQuick, Multispot, VITROS и Clearview выявляют как ВИЧ-1, так и ВИЧ-2. Reveal G2 и UniGold Recombigen лицензированы только для обнаружения ВИЧ-1.

Стандартный протокол серологического тестирования на ВИЧ, применяемый и в нашей стране, включает скрининговый ИФА-тест, который проводится в лаборатории с образцом цельной крови. Положительный результат скринингового ИФА на антитела к ВИЧ необходимо подтвердить «реактивным» результатом повторного ИФА, который и служит показанием для проведения ИБ, поскольку ИФА дает 2% ложноположительных результатов. ИБ позволяет обнаружить антитела к белкам ВИЧ-1, в том числе белкам сердцевины вируса (p17, p24, p55), гликопротеинам оболочки (gp41, gp120, gp160) и ферментам (p31, p51, p66). Результаты ИБ интерпретируются следующим образом – отрицательный, положительный, неопределенный (сомнительный).

У пациентов с развившейся ВИЧ-инфекцией чувствительность стандартного протокола серологического тестирования составляет 99,5%, а специфичность — 99,994% [37, 44]. При получении положительных результатов следует подтвердить диагноз посредством повторных анализов на ВИЧ, а также клиническими или лабораторными данными.

Ложноотрицательные результаты обычно получают в случае обследования в так называемый период «серологического окна», их вероятность колеблется в пределах 0,001–0,3%, в зависимости от распространенности ВИЧ-инфекции в популяции [54]. Промежуток времени от момента инфицирования до обнаружения антител к ВИЧ-методом ИФА составляет в среднем 3–4 недели, однако у некоторых пациентов серонегативный период может затягиваться до 3–8 месяцев [49]. Однако почти у всех ВИЧ-инфицированных сероконверсия происходит в течение 6 месяцев после заражения, хотя у 3% пациентов с отрицательными результатами скринингового анализа на антитела к ВИЧ выявлялся антиген p24.

Другой причиной ложноотрицательного результата может быть серореверсия, хотя она и наблюдается очень редко; официально зарегистрировано 24 случая серореверсии [43]. Чаще всего она наблюдается у детей в возрасте до 1 года, у пациентов, получавших антиретровирусную терапию (АРВТ) до серокон-

версии, и у пациентов, которым поставлен диагноз поздних стадий ВИЧ-инфекции [17, 26]. При этом важно различать исчезновение материнских антител у детей, которые никогда не были инфицированы ВИЧ, и исчезновение антител к ВИЧ у ВИЧ-инфицированных детей.

Кроме того, встречаются «необъяснимые» или «атипичные» ответы. Зарегистрировано несколько достоверно подтвержденных случаев ВИЧ-1-инфекции, протекающей с отрицательными результатами стандартного серологического тестирования, в том числе описан один пациент с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), у которого было получено 35 отрицательных результатов ИФА на ВИЧ за четырехлетний период [42]. «Атипичный иммунный ответ» является причиной редких случаев ложноотрицательных результатов серологического тестирования, и в большинстве случаев ему не удается найти приемлемого объяснения [38]. Диагноз ВИЧ-инфекции в таких случаях устанавливается при помощи определения ВН ВИЧ в плазме крови [23].

Кроме того, диагностирована неспособность организма к формированию иммунного ответа, основной причиной которой является агаммаглобулинемия у пациентов [39]. В редких случаях у пациентов с ложноотрицательными результатами серологического тестирования на поздних стадиях ВИЧ-инфекции после начала антиретровирусной терапии на фоне восстановления иммунной системы происходит серореверсия [24]. В этих случаях диагноз ВИЧ-инфекции подтверждают при помощи определения ВН ВИЧ в плазме крови.

Вместе с тем, большинство коммерческих тест-систем не способны обнаружить антитела к вирусу подтипа О, и ни одна тест-система не выявляет антитела к подтипу N [30], поэтому больных с ВИЧ-инфекцией, вызванной вирусом подтипа О, выявлены единицы [19]. При инфицировании вирусом подтипа N отмечены ложноотрицательные результаты ИФА, хотя при этом результат ИБ был положительным [47].

Чаще всего ложноотрицательные результаты наблюдаются при ВИЧ-2-инфекции, для диагностики которой требуются специальные тест-системы. Однако сообщалось об одном случае серонегативной ВИЧ-инфекции в стадии СПИДа, вызванной ВИЧ-1 подтипа А2 [18].

В отдельных случаях ложноотрицательные результаты получают при применении тест-систем для экспресс-диагностики ВИЧ-инфекции, тогда как стандартное серологическое тестирование дает положительный результат [17]. Ложноотрицательные результаты могут быть также следствием технической или канцелярской ошибки, в результате которой может быть перепутана принадлежность образцов крови [43].

Частота получения ложноположительного результата стандартного серологического тестирования на ВИЧ (ИФА с последующим ИБ) находится в диапазоне 0,0004–0,0007% [55]. Ложноположительный резуль-

тат можно заподозрить, если у пациента отсутствуют факторы риска ВИЧ-инфицирования, не определяется ВН и показатели количества CD4-лимфоцитов в пределах нормы. При отсутствии у пациента других лабораторных маркеров ВИЧ-инфекции, серологическое тестирование следует выполнить повторно, параллельно сделав анализ на ВН.

Возможные причины получения ложноположительного результата:

- аутоантитела (в литературе опубликовано единственное сообщение о случае ложноположительного результата серологического тестирования на ВИЧ, который сначала был объяснен наличием аутоантител, однако впоследствии диагноз ВИЧ-инфекции у этого пациента подтвердился выделением культуры вируса [41]);

- введение экспериментальных вакцин против ВИЧ [21] (в плане дифференциальной диагностики с активной ВИЧ-инфекцией выполняются ИБ и анализ на ВН);

- вакцинация против гриппа вакциной любого производителя может быть причиной ложноположительного результата скринингового тестирования на ВИЧ-1, предположительно вследствие наличия гомологичных аминокислотных последовательностей у оболочечных белков этих вирусов [27] (подтверждающие тесты дают отрицательные результаты);

- ложноположительные результаты экспресс-тестов для скрининговой диагностики ВИЧ-инфекции. Причину получения ложноположительного результата обычно установить не удается, однако в некоторых случаях такой результат получают у пациентов с другими инфекциями, особенно паразитарными (малярия, лихорадка денге, трипаносомоз, шистосомоз), возможно, вследствие поликлональной активации В-лимфоцитов [29, 34] (в связи с этим очень важно проводить подтверждающие тесты);

- техническая или канцелярская ошибка [55].

Сомнительный результат ИБ получают в 4–20% всех случаев, поэтому при получении такого результата тестирование на ВИЧ следует повторить через месяц или позже. У пациентов с сомнительным результатом ИБ, проведенным до завершения сероконверсии, как правило, очень высокая ВН, а положительный результат иммуноблота можно получить уже через месяц [37]. Возможные причины получения сомнительного результата:

- серологическое обследование проводилось в периоде сероконверсии (обычно первыми появляются антитела к р24);

- поздние стадии ВИЧ-инфекции, когда обычно исчезают антитела к белкам сердцевин вируса;

- наличие перекрестно реагирующих неспецифических антител, которые появляются при коллагенозах, васкулитах, других аутоиммунных заболеваниях, лимфомах, заболеваемости печени, инъекционном употреблении наркотиков, рассеянном склерозе, во время беременности и после недавней вакцинации;

- инфекция штаммом О ВИЧ-1, или ВИЧ-2;

- вакцинация против ВИЧ;

- при беременности возможен положительный результат скринингового ИФА в сочетании с отрицательным или сомнительным результатом ИБ (после родов сомнительный результат ИБ обычно становится отрицательным) [33];

- техническая или канцелярская ошибка, при этом в случае получения сомнительного результата наиболее важно оценить риск инфицирования и определить ВН.

ИФА-диагностикумы для выявления ВИЧ постоянно совершенствуются, и сейчас производится уже четвертое поколение таких тест-систем (например, ARCHITECT AG/AB COMBO, производства компании Abbott), которые выявляют не только антитела к ВИЧ, но и антиген р24. Это позволяет выявить ВИЧ-инфекцию в острой стадии, сократить период «серологического окна» на 8–10 дней по сравнению с тест-системами третьего поколения [40] и обнаружить как ВИЧ-1, так и ВИЧ-2, что позволяет выявить ВИЧ в 0,08–0,3% серонегативных образцов в популяциях с высокой распространенностью ВИЧ-инфекции [28, 31].

Вместе с тем, необходимо отметить случаи положительных результатов ИФА при отрицательном ИБ, окончательное заключение по которым может быть выдано только при использовании более совершенных методов диагностики [4]. Самым чувствительным методом на сегодняшний день для выявления ДНК ВИЧ-1 является метод ПЦР. С его помощью можно обнаружить от 1 до 10 копий провирусной ДНК ВИЧ, однако реактивы для данного метода пока должны образцом не стандартизованы. В соответствии с п. 8.4.2.7. «Санитарных правил 3.1.5.2826-10» [8], молекулярно-биологические исследования (ПЦР, NAT) проводятся дополнительно к обязательным иммунологическим исследованиям (ИФА) на маркеры гемотрансмиссивных инфекций в соответствии с требованиями нормативной документации и имеют вспомогательное значение.

Для количественного определения РНК ВИЧ в плазме крови (ВН) в настоящее время используются следующие методы: ПЦР на РНК ВИЧ (анализаторы «Amplicor HIV-1 Monitor Test 1.5» и «COBAS TagMan HIV-1 test», производства компании «Roche»); метод разветвленной ДНК (рДНК) (анализаторы «VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA)», производства компании «Siemens Diagnostics»); изотермальная реакция амплификации последовательностей нуклеиновых кислот (NASBA) (анализаторы «NucliSens HIV-1 QT», производства компании «BioMerieux»). Производство подобной отечественной аппаратуры пока не налажено.

У каждой диагностической тест-системы есть свой нижний порог и динамический диапазон чувствительности. Так, 95% доверительный интервал для значения 10000 копий/мл составляет 3100–32000 копий/мл [25]. Разработаны тест-системы с нижним порогом определения в 20 копий/мл [48].

Выявлены различия результатов измерений ВН в зависимости от подтипа ВИЧ. Стандартные методы её определения дают наиболее точные результаты для ВИЧ подтипа В, а также позволяют количественно определить РНК ВИЧ подтипов А–С. При определении ВН не В-подтипов ВИЧ наблюдается большой разброс показателей [51]. Хотя известно, что многие пациенты инфицированы и ВИЧ-1 и ВИЧ-2, для определения ВН и резистентных свойств ВИЧ-2 коммерческих тест-систем на сегодняшний день нет, такие исследования выполняются только в отдельных специализированных лабораториях [45].

Амплификация нуклеиновых кислот (АНК, NAT) дает положительный результат на 11 дней раньше, чем ИФА с использованием тест-систем третьего поколения, и на 6 дней раньше, чем ИФА с использованием тест-систем четвертого поколения [22], в основном применяется для проверки пулов (смесей) ИФА-отрицательных образцов крови для более эффективного выявления острой ВИЧ-инфекции. Доля обнаружения антигена р24 в образцах с положительным результатом исследования методом АНК составляет от 62,0% до 84–100% при уровне ВН 700–15 000 копий/мл [28].

Альтернативным методом серологического тестирования на ВИЧ является иммунофлюоресцентный анализ, который по сравнению с ИБ обладает некоторыми преимуществами: он более прост в исполнении, более дешёв и быстрее дает результат. В основном этот метод применяется в регионах с ограниченными ресурсами.

Описанные выше методы не дают более точных результатов, чем стандартный протокол серологического тестирования, но они могут быть полезны для уточнения сомнительных результатов серологических анализов, а также для диагностики ВИЧ-инфекции в случаях, когда серологическое тестирование может со значительной вероятностью давать ошибочный результат (пациенты с агаммаглобулинемией, острой ретровирусной инфекцией, новорожденные, лица после инфицирования в периоде «серологического окна»). В большинстве случаев положительные результаты серологического анализа достаточно подтвердить с помощью повторного серологического анализа или анализа на ВН.

Таким образом, совершенствование методов тестирования донорской крови на маркеры гемотрансмиссивных инфекций и внедрение новых высокотехнологичных методов лабораторной диагностики в службу крови позволит уменьшить вероятность инфицирования реципиента при гемотрансфузии [9], хотя минимальный риск посттрансфузионной передачи всё же существует. Это чрезвычайно важно не только для безопасности заготавливаемых компонентов крови, но и для здоровья самих доноров. Вместе с тем, эффективность скрининга зависит от корректного использования диагностических методов в лабораториях, должным образом оснащенных и укомплектованных персоналом, работающим в рамках отлаженных систем качества.

Литература

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации 2009: справочник / под ред. Г.Г. Онищенко и А.Б. Жебруна. – СПб.: НИИЭМ им. Л. Пастера, 2009. – 380 с.
2. Гришина, О.В. Организационные аспекты работы учреждений службы крови при ликвидации медицинских последствий чрезвычайных ситуаций / О.В. Гришина, А.В. Замуриев, П.В. Рейзман // Вестн. службы крови России. – 2010. – № 3. – С. 3–5.
3. Громова, Н.И. Эффективность противовирусной терапии больных хроническим гепатитом В / Н.И. Громова // Инфекционные болезни. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 15–20.
4. Кузнецов, О.Е. Эффективность ПЦР тестирования доноров крови с использованием отечественных разработок ФГБУ РНЦХ им. академика Б.В. Петровского РАМН, Москва / О.Е. Кузнецов [и др.] // Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови: материалы Всеросс. науч.-практ. конф. с международным участием, посв. 70-летию лаборатории бактериологии Росс. НИИ гематологии и трансфузиологии. – Вестн. гематологии. – 2012. – Т. 8, № 1. – С. 59–60.
5. Кузнецов, П.Л. Клинико-лабораторные особенности течения фульминантной формы вирусных гепатитов В и D с учетом связывающей способности сывороточного альбумина: автореф. дисс. ... канд. мед. наук / П.Л. Кузнецов. – Екатеринбург, 2005. – 24 с.
6. Кузнецова, А.В. Клинико-экономический анализ применения пегилированных интерферонов при хроническом гепатите С / А.В. Кузнецова [и др.] // Инфекционные болезни. – 2012. – Т. 10, № 3. – С. 10–14.
7. Пелешок, С.А. Факторы риска и профилактика инфекций, передающихся через кровь / С.А. Пелешок [и др.] // Актуальные проблемы трансфузиологии: материалы Росс. науч.-практ. конф. – СПб., 2011. – С. 78–80.
8. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ № 1 от 11.01.2011 г. Об утверждении СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции» // Росс. газета. – 2011. – № 5457, 15.04. – С. 22.
9. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 28.03.2012 г. № 278н «Об утверждении требований к организациям здравоохранения (структурным подразделениям), осуществляющим заготовку, переработку, хранение и обеспечение безопасности донорской крови и её компонентов, и перечня оборудования для их оснащения». // Росс. газета. – 2012. – № 5835, 18.07. – С. 29.
10. Ренева, Л.В. Обеспечение вирусной безопасности донорской плазмы, используемой в производстве препаратов крови / Л.В. Ренева, Л.В. Волкова, А.В. Казьянин // Вестн. службы крови России. – 2011. – № 4. – С. 19–23.
11. Ряженов, В.В. Фармакоэкономический анализ применения противовирусных препаратов при хроническом гепатите В / В.В. Ряженов // Инфекционные болезни. – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 13–18.
12. Селиванов, Е.А. Частота выявления маркеров вирусных инфекций у доноров крови и её компонентов в Российской Федерации / Е.А. Селиванов [и др.] // Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови: материалы Всеросс. науч.-практ. конф. с международным участием, посв. 70-летию лаборатории бактериологии Росс. НИИ гематологии и трансфузиологии. – Вестн. гематологии. – 2012. – Т. 8, № 1. – С. 78–79.
13. Соломаха, А.А. Современные проблемы инфузионно-трансфузионной терапии лечебно-профилактического учреждения в условиях экономического кризиса / А.А. Соломаха, Д.В. Кочетков, Д.А. Соломаха // Вестн. службы крови России. – 2009. – № 4. – С. 21–22.
14. Шахгильдян, И.В. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика) / И.В. Шахгильдян, М.И. Михайлов, Г.Г. Онищенко. – М.: ВУНМЦ, 2003. – 384 с.

15. Ющук, Н.Д. Протокол диагностики и лечения больных вирусными гепатитами В и С / Н.Д. Ющук [и др.] // Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2010. – Т. 20, № 6. – С. 4–60.
16. Ястребова, О.Н. Гепатит С. – Новосибирск: ЗАО «Вектор-Бест», 2003. – 44 с.
17. Brown, P. Repeatedly false-negative rapid HIV test results in a patient with undiagnosed advanced AIDS / P. Brown [et al.] // *Ann. intern. med.* – 2008. – Vol. 149, № 1. – P. 71–72.
18. Cardoso, A.R. Seronegative infection and AIDS caused by an A2 subtype HIV-1 / A.R. Cardoso [et al.] // *AIDS*. – 2004. – Vol. 18, № 7. – P. 1071–1074.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Identification of HIV-1 group O infection // *MMWR*. – 1996. – Vol. 45, № 26. – P. 561–565.
20. Ciccaglione, A.R. Improving HIV-2 detection by a combination of serological and nucleic acid amplification test assays / A.R. Ciccaglione [et al.] // *J. clin. microbiol.* – 2010. – Vol. 48, № 8. – P. 2902–2908.
21. Cooper, C.J. Vaccine-induced HIV seropositivity/reactivity in noninfected HIV vaccine recipients / C.J. Cooper [et al.] // *JAMA*. – 2010. – Vol. 304, № 3. – P. 275–283.
22. D'Souza, M.P. Acute HIV-1 infection: what's new? Where are we going? / M.P. D'Souza [et al.] // *J. infect. dis.* – 2010. – Vol. 202, № 2. – P. 267–269.
23. Daar, E.S. Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network / E.S. Daar [et al.] // *Ann. intern. med.* – 2001. – Vol. 134, № 1. – P. 25–29.
24. Dalmau, J. Contribution of immunological and virological factors to extremely severe primary HIV type 1 infection / J. Dalmau [et al.] // *Clin. infect. dis.* – 2009. – Vol. 48, № 2. – P. 229–238.
25. Damond, F. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) plasma load discrepancies between the Roche COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Version 1.5 and the Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 assays / F. Damond [et al.] // *J. clin. microbiol.* – 2007. – Vol. 45, № 10. – P. 3436–3438.
26. Eberle, J. Seroreversion in vertically HIV-1-infected children treated early and efficiently: rule or exception? / J. Eberle [et al.] // *AIDS*. – 2010. – Vol. 24, № 17. – P. 2760–2761.
27. Erickson, C.P. Influenza vaccination and false positive HIV results / C.P. Erickson, T. McNiff, J.D. Klausner // *N. engl. j. med.* – 2006. – Vol. 354, № 13. – P. 1422–1423.
28. Eshleman, S.H. Detection of individuals with acute HIV-1 infection using the ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo assay / S.H. Eshleman [et al.] // *J. acquir. immune defic. syndr.* – 2009. – Vol. 52, № 1. – P. 121–124.
29. Everett, D.B. Association of schistosomiasis with false-positive HIV test results in an African adolescent population / D.B. Everett [et al.] // *J. clin. microbiol.* – 2010. – Vol. 48, № 5. – P. 1570–1577.
30. Gautheret-Dejean, A. Unequal detection of HIV type 1 group O infection by simple rapid tests / A. Gautheret-Dejean [et al.] // *Clin. infect. dis.* – 2008. – Vol. 46, № 12. – P. 1936–1937.
31. Gous, N. Should South Africa be performing nucleic acid testing on HIV enzyme-linked immunosorbent assay-negative samples? / N. Gous [et al.] // *J. clin. microbiol.* – 2010. – Vol. 48, № 9. – P. 3407–3409.
32. Gürtler, L. Difficulties and strategies of HIV diagnosis / L. Gürtler // *Lancet*. – 1996. – Vol. 348, № 9021. – P. 176–179.
33. Idris, B.I. Estimating the future health burden of chronic hepatitis B and the impact of therapy in Spain / B.I. Idris [et al.] // *Eur. j. gastroenterol. hepatol.* – 2008. – Vol. 20, № 4. – P. 320–326.
34. Loc, A. Chronic hepatitis B: update 2009 / A. Loc, D. McMahon // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 50, № 1. – P. 1–36.
35. Martin-Carbonero, L. Clearance of hepatitis C virus in HIV-infected patients with multiple chronic viral hepatitis / L. Martin-Carbonero [et al.] // *J. viral hepat.* – 2007. – Vol. 14, № 6. – P. 392–395.
36. Mathurin, P. Replication status and histological features of patients with triple (D, C, D) and dual (B, C) hepatic infections / P. Mathurin [et al.] // *J. viral hepat.* – 2000. – Vol. 7, № 1. – P. 15–22.
37. Mylonakis, E. Report of a false-positive HIV test result and the potential use of additional tests in establishing HIV serostatus / E. Mylonakis [et al.] // *Arch. intern. med.* – 2000. – Vol. 160, № 15. – P. 2386–2388.
38. O'Connell, R.J. Performance of the OraQuick rapid antibody test for diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection in patients with various levels of exposure to highly active antiretroviral therapy / R.J. O'Connell [et al.] // *J. clin. microbiol.* – 2003. – Vol. 41, № 5. – P. 2153–2155.
39. Ortiz de Lejarazu, R. HIV-1 infection in persistently HIV-1-seronegative individuals: more reasons for HIV RNA screening / R. Ortiz de Lejarazu [et al.] // *Clin. infect. dis.* – 2008. – Vol. 46, № 5. – P. 785.
40. Padeh, Y.C. Common variable immunodeficiency and testing for HIV-1 / Y.C. Padeh, A. Rubinstein, J. Shliozberg // *N. engl. j. med.* – 2005. – Vol. 353, № 10. – P. 1074–1075.
41. Plantier, J.C. Census and analysis of persistent false-negative results in serological diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 group O infections / J.C. Plantier [et al.] // *J. clin. microbiol.* – 2009. – Vol. 47, № 9. – P. 2906–2911.
42. Puoti, M. Impact of lamivudine on the risk of liver-related death in 2,041 HBsAg- and HIV-positive individuals: results from an inter-cohort analysis / M. Puoti [et al.] // *Antivir. ther.* – 2006. – Vol. 11, № 5. – P. 567–574.
43. Rosenthal, E. Liver-related deaths in HIV-infected patients between 1995 and 2005 in the French GERMIVIC Joint Study Group Network / E. Rosenthal [et al.] // *HIV med.* – 2009. – Vol. 10, № 5. – P. 282–289.
44. Roy, M.J. Absence of true seroreversion of HIV-1 antibody in seroreactive individuals / M.J. Roy, J.J. Damato, D.S. Burke // *JAMA*. – 1993. – Vol. 269, № 22. – P. 2876–2879.
45. Schumacher, W. Fully automated quantification of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system / W. Schumacher [et al.] // *J. clin. virol.* – 2007. – Vol. 38, № 4. – P. 304–312.
46. Sheldon, J. Does treatment of hepatitis B virus (HBV) infection reduce hepatitis delta virus (HDV) replication in HIV-HBV-HDV co-infected patients? / J. Sheldon [et al.] // *Antivir. ther.* – 2008. – Vol. 13, № 1. – P. 97–102.
47. Sheldon, J. Hepatitis B escape mutants induced by antiviral therapy / J. Sheldon, V. Soriano // *J. antimicrob. chemoter.* – 2008. – Vol. 61, № 4. – P. 766–768.
48. Schim van der Loeff, M.F. Mortality of HIV-1, HIV-2 and HIV-1/HIV-2 dually infected patients in a clinic-based cohort in The Gambia / M.F. Schim van der Loeff [et al.] // *AIDS*. – 2002. – Vol. 16, № 13. – P. 1775–1783.
49. Simon, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O / F. Simon [et al.] // *Nat. med.* – 1998. – Vol. 4, № 9. – P. 1032–1037.
50. Sizmann, D. Improved HIV-1 RNA quantitation by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, v2.0 using a novel dual-target approach / D. Sizmann [et al.] // *J. clin. virol.* – 2010. – Vol. 49, № 1. – P. 41–46.
51. Spivak, A.M. A case of seronegative HIV-1 infection / A.M. Spivak [et al.] // *J. infect. dis.* – 2010. – Vol. 201, № 3. – P. 341–345.
52. Tang, J.W. Failure to confirm HIV infection in two end-stage HIV/AIDS patients using a popular commercial line immunoassay / J.W. Tang [et al.] // *J. med. virol.* – 2008. – Vol. 80, № 9. – P. 1515–1522.
53. Thio, C.L. Treatment of HIV-HBV co-infection: clinical and virological issues / C.L. Thio, S. Locarnini // *AIDS rev.* – 2007. – Vol. 9, № 1. – P. 40–53.
54. Thio, C.L. Multicenter AIDS Cohort Study. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort

Study (MACS) / C.L. Thio [et al.] // Lancet. – 2002. – Vol. 360, № 9349. – P. 1921–1926.

55. Torian, L.V. HIV type 2 in New York City, 2000-2008 / L.V. Torian [et al.] // Clin. infect. dis. – 2010. – Vol. 51, № 11. – P. 1334–1342.

I.M. Ulyukin, Yu.I. Bulankov, V.N. Bolekhan, A.V. Apchel, E.S. Orlova, N.G. Lebedeva

Challenges of laboratory distinction of blood transmitted infections

Abstract. *Currently there is an increase surgical activity and aggressive medical interventions occurs in the diagnostic and treatment process that are made by disadvantaged background (immunosuppression, early neonatal life, old age), with a significant technical increasing of the diagnostic and therapeutic procedures complexity. Transfusions is primarily used in surgical departments with high demand of blood components, the most sought after plasma and red cells, as well as albumin and platelet components. Screening for blood transmitted infections to exclude blood donations with the risk of transmission from donor to recipient is an important part of the process to ensure the safest possible transfusion. It was shown that the improvement of the methods of donated blood testing for that infections markers and the inculcation of new high-tech methods for laboratory diagnostics in the organization of the blood service will reduce the infection chance by blood transfusion for recipient, although a minimal risk of post-transfusion transmission still exists. The reasons for the occurrence of false positive and false negative results, atypical responses are discussed. It is noted that the screening effectiveness depends on the correct use of diagnostic tests in laboratories which properly equipped and staffed by personnel working within established systems of quality.*

Key words: *blood transmitted infections, viral hepatitis B and C, инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека, components of blood, laboratory diagnosis, false-positive and false-negative results, atypical responses.*

Контактный телефон: 8 (812) 292-34-61; +7-921-926-16-21; e-mail: igor_ulyukin@mail.ru